

18. Mihailovic M., Zlic V., Lindberg P.: Acta Vet., Beograd 46, 27, 1996.
19. Novelli E. L. B., Rodriguez N. L., Chicchio S. B.: Acta Hung. 41, 151, 1993.
20. Ono K., Inui K., Hasegawa T., Matsuki N.: Jap. J. Vet. Sci., 52, 759, 1990.
21. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures. TAS, 2, 10, 91, 1996.
22. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures superoxidate dismutase. 27, 2, 90, 1996.
23. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures glutathione peroxidase, 1/8, 88, 1996.
24. Smart D., Melusker C. M., Lamont J. V.: Internal Congres of elin Chemistry, London 548, 1996.
25. Stes H.: Oxidative Stress. Acad. Press. New York, 1985.
26. Van der Vlet, Bast A.: Free Rad. Biol. Med. 12, 499, 1992.
27. Wayner D. D. M.: Free Rad. Biol. Med. 2, 419, 1996.

Adres autora: prof. dr hab. Ewa Sitarska, ul. Międzynarodowa 20/14, 03-922 Warszawa

WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI, ANNA WINNICKA, JERZY KAWIAK*, GRAŻYNA HOSER*,
BARBARA MIKS*, ROBERT BAŃKOWSKI, EWA SITARSKA, MIROŚLAW KLECZKOWSKI

Analiza subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przeżuwaczy metodą cytometrii przepływowej*)

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

*Zakład Cytologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Summary

Examination of ruminant lymphocyte subpopulations by flow cytometry

Flow cytometry is one of the most modern methods of qualitative and quantitative evaluation of cells, e.g. blood cells. Different cell populations are analysed separately by „leucogate”, being distinguished by their scatter (forward and side) profiles.

The aim of the research was to establish reference values of lymphocyte subpopulations in ruminants by FACS analysis. Whole blood samples were analysed. Populations of leukocytes were determined with a set of specific monoclonal antibodies against: CD45, CD14, CD2, CD4, CD8, CD 19, while „null” populations were labelled FITC and PE. Erythrocytes were lysed with FACS lysing solution. Data acquisition and analysis were done with SimulSet in FACStrak (Becton Dickinson) and additionally analysed with the PC-Lysis program. Obtained results have been presented as a mean of percent and total numbers per liter with a standard deviation. Statistical differences between the results obtained in the research of ruminant species were observed. The presented studies have shown that the above methods can be useful in the phenotyping of animal cells.

rzeń. Do nowej generacji metod tej kategorii należy cytometria przepływowa umożliwiająca precyzyjną ocenę jakościową i ilościową elementów morfotycznych we krwi oraz w innym materiale. Podstawą badania materiału biologicznego przy użyciu analizatora – cytofluorometru jest prawidłowo przeprowadzona reakcja immunologiczna z właściwymi przeciwciałami monoklonalnymi. Właśnie produkcja i dostępność przeciwciał monoklonalnych stały się bodźcem do rozwoju tej metody badawczej. Główną zaletą przeprowadzenia analizy cytometrycznej jest możliwość zbadania dużej liczby komórek (kilkadziesiąt tysięcy) w różnym materiale biologicznym (krew, szpik kostny, węzły chłonne, wypłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, mleko). Badanie to prowadzi do ustalenia immunofenotypu komórek, co może być pomocne w diagnostyce chorób układu krwiotwórczego, chorób płuc, chorób autoimmunizacyjnych i nowotworowych, a także wrodzonych i nabytych niedoborów immunologicznych oraz stanów immunosupresji. Metoda ta zastąpiła m.in. stosowaną dotychczas ocenę ilości limfocytów T przy pomocy testu rozetkowego i poszerzyła badania immunofluorescencyjne przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (5).

Ponadto przy pomocy cytometrii przepływowej można określić stan czynnościowy pojedynczych komórek i ich substruktur poprzez pomiar zawartości DNA, poszukiwanie ekspresji określonych białek i sekwencji nukleotydów RNA, obserwację aktywacji komórek czy wreszcie opis mechanizmów śmierci komórki (7, 10).

Postęp jakiego dokonano w ostatnich 20 latach w zakresie konstrukcji aparatury spektrofluorometrycznej opartej na technikach komputerowych spowodował niezwykle szybki rozwój nowych metod badawczych, które nabierają coraz większego znaczenia w diagnostyce laboratoryjnej wielu scho-

*) Praca częściowo finansowana z grantu KBN 5 S 31002206

Celem podjętych badań było ustalenie zakresu wartości prawidłowych odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów, a także liczby bezwzględnej (G/l) tych komórek w organizmach zdrowego, dorosłego bydła, owiec i kóz oraz porównanie wyników do wartości otrzymywanych przez innych autorów (2, 3, 6, 8, 11).

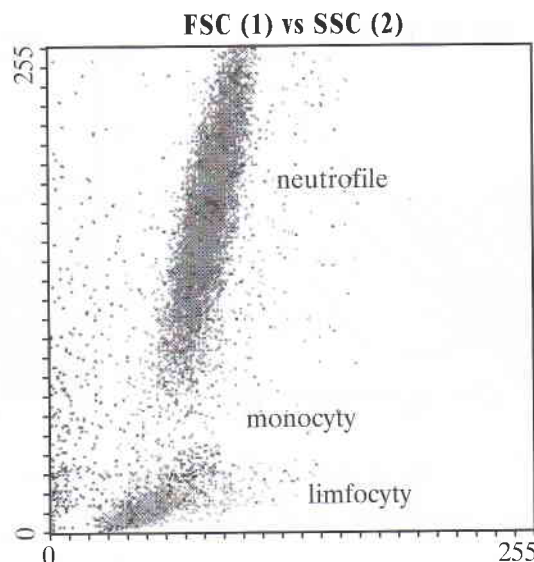
Materiał i metody

Jako markera limfocytów T użyto antygenu powierzchniowego CD2 (CD – cluster of differentiation) rozpoznawanego u badanych gatunków przeżuwaczy (9). Markerm limfocytów T-pomocniczych jest cząsteczka CD4, a T-cytotoksycznych/supresorowych cząsteczka CD8. Limfocyty B rozpoznawano przy pomocy przeciwciała monoklonalnego anti-B-B2 wiążącego się z cząsteczką analogiczną do ludzkiego CD19, natomiast komórki nie-T i nie-B czyli „null” przy pomocy przeciwciała WC1 – N2.

Badania przeprowadzono na dorosłych, klinicznie zdrowych przeżuwaczach (8 krowach rasy ncb, 8 owcach – wrzosówkach i 18 kozach rasy saaneńskiej).

Wyniki podstawowych analiz hematologicznych i biochemicznych krwi obwodowej tych zwierząt mieściły się w zakresach wartości prawidłowych.

Do analizy populacji leukocytów i subpopulacji limfocytów używano przeciwciał monoklonalnych wyprodukowanych przez VMDR Inc. Pullman (USA), których charakterystykę zamieszczono w tabeli 1 (4). Dla wyodrębnienia limfocytów niezbędne było umieszczenie w panelu prób opisujących leukocyty krwi zwierzęcia, tzw. „leukogate”, czyli próbówki zawierającej przeciwciało anti-CD45 (a w odniesieniu do owcy, eksperymentalnie użyto anti-CD45R). Różne populacje leukocytów mają różną ekspresję powierzchniowego antygenu CD45 (fosfatazy białkowej), co pozwala wykreślić okna (gates) dla limfocytów, monocytów i granulocytów. Pomocne w tym jest też przeciwciało anti-GM1 wiążące się z granulocytami i monocytami (zbliżone do ludzkiego antygenu CD14 na monocytach). Komórki w oknie limfocytów można również zlokalizować na wykresie FSC/SSC (ryc. 1).



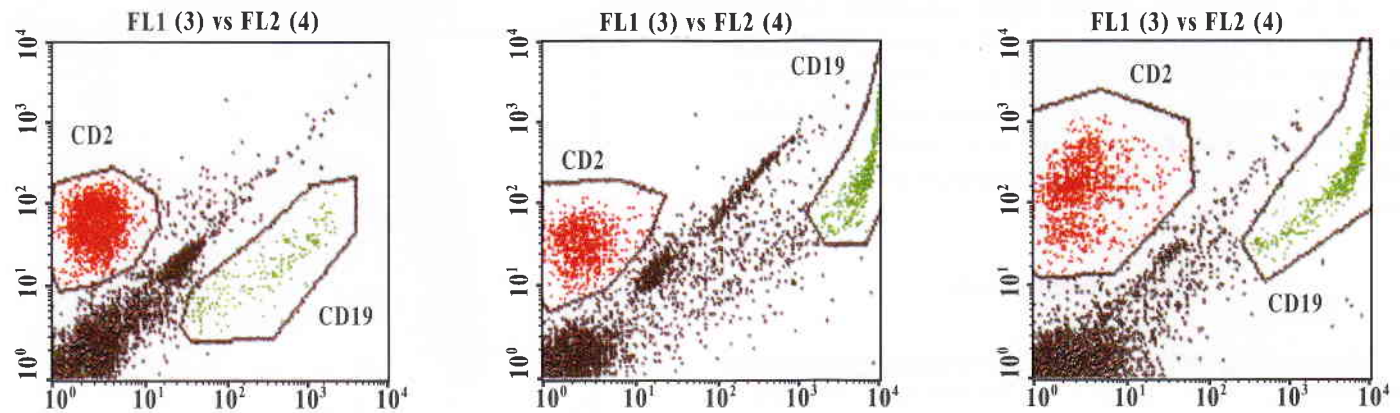
Ryc. 1. Rozkład populacji leukocytów na przykładzie krwi obwodowej kozy

Próba kontrolna zawierała wyłącznie komórki i przeciwciała nieznakowane. Limfocyty T i B określano parą przeciwciał monoklonalnych: anti-CD2 i anti-CD19 (ryc. 2), analogicznie limfocyty pomocnicze i cytotoksyczne/supresorowe parą: anti-CD4 i anti-CD8 albo anti-CD2 i anti-CD4 oraz anti-CD2 i anti-CD8 (ryc. 3). Natomiast komórki „null” oznaczono jednym przeciwciałem.

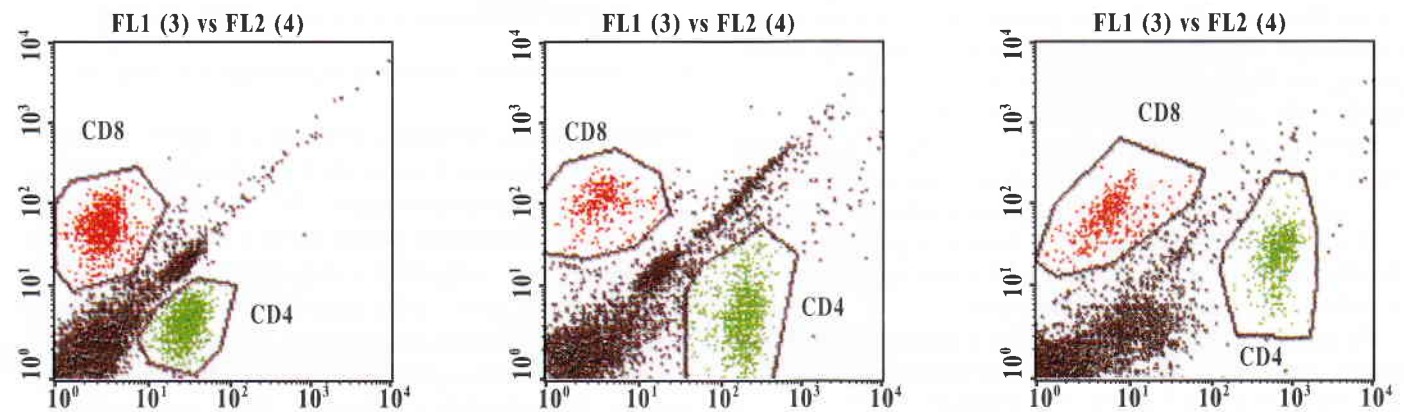
Reakcje immunocytochemiczne przeprowadzano metodami: bezpośrednią i pośrednią. Przy zastosowaniu w tej samej próbce pary przeciwciał monoklonalnych o jednakowych izotypach wykorzystywano metodę bezpośrednią, w której używano przeciwciała monoklonalnego połączonego z fluoresceiną – FITC (12). Drugie przeciwciało było biotynylowane i wiązane w dodatkowej inkubacji ze Streptawidyną znakowaną fikoerytryną (PE) (Becton-Dickinson). Jeżeli używano w tej samej próbce pary przeciwciał monoklonalnych o różnych izotypach, np. IgG1 i IgM, stosowano metodę pośredniego wiązania z odpowiednim fluorochromem poprzez dodatkowe przeciwciało monoklonalne skoniugowane z FITC lub PE (MEDAC, Niemcy).

Tab. 1. Zestawienie przeciwciał monoklonalnych używanych w badaniach immunofenotypów limfocytów krwi obwodowej

Przeciwciała monoklonalne Klon hybrydoma	Immunofenotyp limfocytów	Izotyp przeciwciała	Gatunki zwierząt		
			bydło (Bo)	owce (Ov)	kozy (Go)
CACTB51A	CD45+	IgG2	+	-	-
BAGB20A		IgG1	-	-	+
GC6A	CD45R+	IgM	-	+	-
DH59B	GM1 (SWC3)+	IgG1	+	+	+
MUC2A	CD2+	IgG2	+	+	+
GC50A1	CD4+	IgM	+	+	+
CACT80A	CD8+	IgG1	+	+	+
BAQ44A	B-B2 (BoCD19+)	IgM	+	+	+
BAQ4A	WC1-N2 („null”)+	IgG1	+	+	+



Ryc. 2. Analiza cytometryczna obrazu fluorescencji limfocytów CD2 i CD19 pozytywnych (bydło, owce, kozy)



Ryc. 3. Analiza cytometryczna obrazu fluorescencji limfocytów CD4 i CD8 pozytywnych (bydło, owce, kozy)

Znakowania komórek dokonywano we krwi pełnej żyłnej (10% EDTA) w objętości 50 μ l poprzez dodanie przeciwciał monoklonalnych i inkubację przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Nadmiar przeciwciał niezwiązanych z komórkami wypłukiwano 2 ml PBS z 10% ACD, 0,2% NaN_3 , 10 mM EDTA, 2% surowicą końską pozbawioną IgG i wirowanie 5 min. przy 150 g. W analogiczny sposób przeprowadzono reakcje z kolejnymi przeciwciałami monoklonalnymi, po każdej inkubacji odpłukując komórki z resztek przeciwciał monoklonalnych. Po związaniu antygenów powierzchniowych z przeciwciałami połączonymi z fluorochromami lizowano erytrocyty przy pomocy FACS - lysing Solution (Becton-Dickinson). Pozostałe błony erytrocytarne wraz z uwolnioną hemoglobina wypłukiwano PBS z 10% ACD, 0,2% NaN_3 i 10 mM EDTA. Po odwirowaniu komórki zawieszano w PBS z 2% formaldehydem.

Odczytu wyników dokonywano przy użyciu cytometru przepływowego FACStrak (Becton-Dickinson) i programu sterującego zbiorem danych SimulSET. Analizę cytometryczną przeprowadzono przy użyciu programów PC-LYSYS oraz winMDI. Prawidłowość odczytu i interpretacji wyników była kontrolowana w testach CEQUAL – międzynarodowym programie standaryzacji laboratoriów cytometrycznych, potwierdzanych certyfikatami.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich wartości odsetka i liczb bezwzględnych wraz z odchyleniami standardowymi, co daje ogólny pogląd o wartościach prawidłowych poszczególnych subpopulacji limfocytów porównywanych gatunków przeżuwaczy.

Analizując wyniki limfocytów CD2+ u tych zwierząt, statystycznie istotną, niższą wartość odsetkową stwierdzono u kóz w porównaniu do pozostałych gatunków. Wartości bezwzględne liczby tej populacji komórek nie różnią się istotnie ze względu na

Tab. 2. Odsetek i liczba poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej bydła ($x \pm s$; $n = 8$); ogólna liczba limfocytów = $4,43 \pm 0,40$ G/l

Subpopulacje limfocytów	Odsetek	Liczba $\times 10^9/l$
BoCD2+	$60,88 \pm 6,38$	$3,20 \pm 1,38$
BoCD4+	$36,13 \pm 3,44$	$1,60 \pm 0,22$
BoCD8+	$21,63 \pm 4,37$	$0,96 \pm 0,23$
BoCD4+ : BoCD8+	1,67	1,67
B-B2 (BoCD19+)	$20,75 \pm 2,92$	$0,92 \pm 0,17$
WC1-N2 („null”)+	$5,63 \pm 0,92$	$0,25 \pm 0,04$

Tab. 3. Odsetek i liczba poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej owiec ($x \pm s$; $n = 8$); ogólna liczba limfocytów = $4,18 \pm 2,48$ G/l

Subpopulacje limfocytów	Odsetek	Liczba $\times 10^9/l$
OvCD2+	63,88 \pm 14,15	2,64 \pm 1,86
OvCD4+	39,25 \pm 6,41	1,67 \pm 1,17
OvCD8+	23,25 \pm 9,10	0,93 \pm 0,76
OvCD4+ : OvCD8+	1,69	1,80
B-B2 (OvCD19+)	23,88 \pm 7,14	0,96 \pm 0,50
WC1-N2 („null”)+	6,88 \pm 3,98	0,32 \pm 0,26

Tab. 4. Odsetek i liczba poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej kóz ($x \pm s$; $n = 8$); ogólna liczba limfocytów = $8,08 \pm 2,17$ G/l

Subpopulacje limfocytów	Odsetek	Liczba $\times 10^9/l$
GoCD2+	41,06 \pm 10,46*** ^c	3,27 \pm 1,09
GoCD4+	26,72 \pm 4,08*** ^c	2,13 \pm 0,56*
GoCD8+	14,67 \pm 5,84** ^b	1,16 \pm 0,51
GoCD4+ : GoCD8+	1,82	1,84
B-B2 (GoCD19+)	29,33 \pm 6,23**	2,38 \pm 0,80*** ^c
WC1-N2 („null”)+	2,33 \pm 2,30** ^b	0,20 \pm 0,23

Objaśnienia: różnice statystycznie istotne w porównaniu do wyników tych subpopulacji limfocytów bydła, przy * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; różnice statystycznie istotne w porównaniu do wyników tych subpopulacji limfocytów owiec, przy ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$.

znacznie wyższą liczbę limfocytów u kóz (tab. 2, 3, 4). Davis i wsp. wykazali niższy odsetek tej

PALACIO J., LISTE F., GASCON M.: Enzymuria jako wskaźnik uszkodzenia nerek w przebiegu leishmaniozy u psów. (Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis). Vet. Rec. 140, 477-480, 1997 (18)

Przebadano aktywność aminopeptydazy alaninowej, γ -glutamylowej transpeptydazy, fosfatazy zasadowej, N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, β -glukuronidazy w moczu 15 psów zarażonych leishmaniozą oraz w moczu 8 zdrowych psów. U zarażonych psów poziom azotu mocznikowego (mmol/L), kreatyniny (μ mol/L) w surowicy krwi wynosił odpowiednio $1,4 \pm 0,5$ oraz $97,2 \pm 8,8$, a u psów zdrowych $1,4 \pm 0,3$ i $79,6 \pm 17,7$. W moczu chorych psów poziom białka wynosił $2,9$ g/L, stosunek białka w moczu do kreatyniny $2,2$, aktywność (j/gCr) aminopeptydazy alaninowej $2,6 \pm 2,7$, γ -glutamylowej transpeptydazy 67 ± 71 , fosfatazy zasadowej 83 ± 144 , N-acetylo- β -D-glukozaminidazy 50 ± 57 , β -glukuronidazy 17 ± 13 . U zdrowych psów aktywność tych enzymów wynosiła odpowiednio $1,3 \pm 0,2$; $12,9 \pm 4,8$; $15,1 \pm 13,2$; $6,4 \pm 1,8$ i $5,3 \pm 2,6$. Aktywność enzymatyczna moczu odzwierciedla dość dokładnie zakres uszkodzenia nerek.

G.

subpopulacji u bydła, co może się wiązać z użyciem innego przeciwciała (2). Odsetek subpopulacji CD4+ był istotnie niższy u kóz w porównaniu do bydła i owiec. W wartościach bezwzględnych zaś liczba tych komórek była najwyższa u tego gatunku. Uzyskane wyniki mieszczą się w przedziale wartości otrzymywanych przez innych autorów, niezależnie od użytych przeciwciał monoklonalnych (1, 3, 6). Porównując odsetek komórek CD8+ stwierdzono podobne różnice między gatunkami jak przy CD4+. Wartość współczynnika CD4+ : CD8+ u porównywanych gatunków był zbliżony i mieścił się w zakresie 1,7–1,8. Liczba limfocytów B była istotnie wyższa u kóz. Równocześnie wykazano istotnie niższe wartości odsetka limfocytów nie-T, nie-B u kóz w porównaniu do bydła i owiec. Wartości limfocytów B, jak i komórek „null” u omawianych gatunków zwierząt stanowią oryginalne wyniki.

Przeprowadzone badania wykazały przydatność zastosowanej metody w fenotypowaniu komórek zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Bensaid A., Hadam M.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 51, 1991.
2. Davis W. C., Splitter G. S.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 43, 1991.
3. Davis W. C., Ellis J. A.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 121, 1991.
4. Davis W. C.: Monoclonal Antibody Protocols, 45, 149, 1995.
5. Fleisher T. A.: Allerg. Clin. N. Amer. 14, 225, 1994.
6. Hopkins J.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 101, 1991.
7. Kawiak J., Głowacka E., Kawalec M.: Folia Histochem. Cytobiol. 34 Supl. 1, 39, 1996.
8. Keech C. L., Brandon M.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 109, 1991.
9. Larsen R. A., Monaghan M. L., Park Y. H., Hamilton M. J., Ellis J. A., Davis W. C.: Vet. Immunol. Immunopathol. 25, 195, 1990.
10. Lovett E. J.: Lab. Invest. 50, 115, 1984.
11. Mac Hugh N. D., Sopp P.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 65, 1991.
12. Rinderknecht H.: Nature 193, 167, 1962.

Adres autora: prof. dr hab. Włodzimierz Kłuciński, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

CECI L., KIRVAR E., CORELLIU G., BROWN D., SASANELLI M., SPARAGANO O.: Dane wskazujące na zarażenie bydła w południowych Włoszech przez *Theileria buffeli*. (Evidence of *Theileria buffeli* infection in cattle in Southern Italy). Vet. Rec. 140, 581-583, 1997 (22)

W czerwcu 1995 r. wystąpiły u bydła na terenie Apulii objawy wskazujące na theileriozę. Na czoło objawów klinicznych wysuwała się gorączka, utrata łaknienia, wychudzenie, zaburzenia w przeżuwananiu, bladeść błon śluzowych. Badanie laboratoryjne wykazało silną niedokrwistość, anizocytotę, poikilocytotę i leukopenię. Identyfikację gatunku *Theileria* oparto o badanie form pasożyta obecnych w erytrocytach bydła z klinicznymi objawami choroby oraz o wyniki badań serologicznych surowic 8 krów w teście IFAT. Miano swoistych przeciwciał dla *T. buffei* w surowicach krów z klinicznymi objawami choroby wynosiło od 1:640 (2 krowy) do 1:2560. U 5 krów u których choroba przebiegała w postaci subklinicznej miano przeciwciał wahało się od 1:160 do 1:640.

G.